

INFECCIÓN POR *XENOHALLOTIS CALIFORNIENSIS*

1. Ámbito de aplicación

Las infecciones intracitoplásmicas por *Xenohalotis californiensis*, una bacteria de tipo rickettsia, en los epitelios gastrointestinales, causan una enfermedad (denominada síndrome de marchitamiento [Haaker *et al.*, 1992]) en abulones tanto en estado salvaje como de piscifactoría, *Haliotis* spp. (Vetigastropoda: Mollusca [Friedman *et al.*, 2000]). Los signos macroscópicos de la enfermedad incluyen atrofia del pie, glándula digestiva moteada, anorexia, debilidad y letargia (Balseiro *et al.*, 2006; Friedman *et al.*, 2000; Gardner *et al.*, 1995).

2. Información sobre la enfermedad

2.1. Factores del agente

2.1.1. El agente patógeno, cepas del agente

Xenohalotis californiensis es una bacteria intracelular de la familia Anaplasmataceae (Dumler *et al.*, 2001) y está estrechamente relacionada con miembros de los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Cowdria* (Friedman *et al.*, 2000). La enfermedad causada por esta bacteria se denomina síndrome de marchitamiento (Friedman *et al.*, 2002; Haaker *et al.*, 1992) y puede designarse más apropiadamente como rickettsiosis del abulón. No existe información sobre la presencia de cepas distintas de esta bacteria; sin embargo, observaciones recientes han puesto de manifiesto que algunas *X. californiensis* pueden ser infectadas por un bacteriófago (Friedman & Crosson, datos no publicados). La bacteria, que es dimórfica, de forma bacilar a esférica, mide una media de 332 × 1550 nm en la forma bacilar y una media de 1405 nm en el morfotipo esférico. La bacteria se reproduce en el interior de vacuolas intracitoplásmicas de un diámetro de 14–56 µm dentro de los epitelios gastrointestinales (Friedman *et al.*, 2000).

2.1.2. Supervivencia fuera del hospedador

Aunque se cree que *X. californiensis* es un microorganismo intracelular obligado, la bacteria puede sobrevivir fuera del hospedador durante un periodo de tiempo indeterminado, según indican los estudios de transmisión por el agua (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2002; Friedman *et al.*, 2007; Rosenblum *et al.*, 2008).

2.1.3. Estabilidad del agente

Según indica la descontaminación obtenida con éxito en el laboratorio, esta bacteria es inactivada con facilidad mediante la inmersión en lejía a concentración <10%. Además, la exposición del agua de mar con contenido de la bacteria a >10 mg litro⁻¹ [ppm] de hipoclorito cálcico y la desinfección del equipamiento en un baño de yodo rebajado al 1% en agua dulce durante 1 hora son métodos de desinfección eficaces según indica el uso de dichos métodos en un laboratorio marino con flujo de agua de mar y la ausencia de detección de este patógeno en poblaciones de abulones adyacentes (Friedman & Finley, 2003; Friedman, observación personal).

2.1.4. Ciclo de vida

La bacteria se divide mediante fisión binaria (Friedman *et al.*, 2000) y tiene una transmisión horizontal directa (Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2001b). Aunque no es habitual observarla en abulones de piscifactoría hasta que están en condiciones de extracción (tamaño máximo >2,5 cm), el examen mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) de abulones de 6 semanas de edad expuestos sugirió que los abulones de 1–2 mm pueden ser infectados (Moore *et al.*, observaciones no publicadas).

2.2. Factores del hospedador

2.2.1. Especies hospedadoras susceptibles

Xenohalotis californiensis infecta a los miembros del género *Haliotis* y se han observado infecciones naturales en el abulón negro (*H. cracherodii*), el abulón blanco (*H. sorenseni*), el abulón colorado (*H. rufescens*), el abulón amarillo (*H. corrugata*), el abulón verde (*H. fulgens*), el abulón pequeño (*H. diversicolor supertexta*) (Wetchateng, 2008; Wetchateng *et al.*, 2010), el abulón de Europa (*H. tuberculata*) (Balseiro *et al.*, 2006) en instalaciones naturales y en piscifactoría, así como en el abulón plano (*H. wallalensis*) y el abulón japonés (*H. discus-hannai*) en pruebas de laboratorio (Friedman, observaciones no publicadas). No se han estudiado otras especies de abulones. La temperatura es importante tanto para la transmisión del patógeno como para la expresión de la enfermedad (Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 1997; Raimondi *et al.*, 2002; Rosenblum *et al.*, 2008).

2.2.2. Fases susceptibles de la vida del hospedador

Aunque se ha demostrado que todas las fases postlarvianas son susceptibles a la infección por *X. californiensis*, la enfermedad clínica se observa típicamente en animales de edad > 1 año en los abulones de piscifactoría (Friedman, observaciones no publicadas) y en los abulones de todos los tamaños en las poblaciones salvajes analizadas hasta la fecha (por ejemplo, Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 1997; Haaker *et al.*, 1992; Steinbeck *et al.*, 1992; Van Blaricom *et al.*, 1993).

2.2.3. Especies o subpoblaciones predilectas (probabilidad de detección)

La probabilidad de detección aumenta a medida que se incrementa el tamaño del abulón. Los animales de un tamaño inferior a 10 mm tienen una menor probabilidad de detección con el empleo de histología, pero la probabilidad de detección en ellos es igual con el empleo de PCR (Friedman *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2011).

2.2.4. Órganos diana y tejidos infectados

Xenohalotis californiensis infecta las células epiteliales gastrointestinales del esófago posterior, la glándula digestiva y, en menor medida, el intestino (Friedman *et al.*, 2000).

2.2.5. Infección persistente con portadores de por vida

Las infecciones pueden persistir durante periodos de tiempo prolongados sin que se produzca una enfermedad clínica cuando el hospedador se mantiene en una temperatura del agua baja (como por ejemplo 15°C para los abulones rojos), y la exposición a temperaturas del agua de mar elevadas (como por ejemplo >17°C para los abulones rojos, negros y blancos) provoca habitualmente la enfermedad clínica (Friedman & Finley, 2003; Moore *et al.*, 2000; Steinbeck *et al.*, 1992). La variación de las temperaturas del agua de mar, con una temperatura inferior (como por ejemplo 16,5°C para el abulón rojo) puede exacerbar las pérdidas (Moore *et al.*, 2011). Algunos datos recientes sugieren que algunas especies, en especial las que viven en aguas más cálidas, pueden albergar la bacteria sin desarrollar una enfermedad clínica (Wetchateng, 2008; Wetchateng *et al.*, 2010).

2.2.6. Vectores

Aunque no se ha identificado ningún hospedador alternativo, distinto de los haliotidis, se ha sugerido que algunos ascidios coloniales pueden concentrar la bacteria (según indican los datos de PCR). Así pues, existe la posibilidad de que estas especies actúen como vectores para la bacteria, pero está justificada la realización de nuevas investigaciones sobre posibles vectores (J.D. Moore, observación no publicada).

2.2.7. Animales acuáticos salvajes portadores o sospechosos de serlo

Ninguno.

2.3. Patrón de la enfermedad

La enfermedad (síndrome de marchitamiento) se produce a temperaturas del agua elevadas (~18°C y superiores) en abulones con infecciones moderadas o graves (Friedman *et al.*, 2000; 2002; Moore *et al.*, 2000). El periodo de incubación del síndrome de marchitamiento es prolongado y oscila habitualmente entre 3 y 7 meses (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 1997; 2002; Moore *et al.*, 2000; 2001b). La enfermedad clínica se caracteriza por alteraciones morfológicas en la glándula digestiva, que pueden diferir en las distintas especies y que pueden incluir una degeneración (atrofia de túbulos, aumento

de tejidos conjuntivos e inflamación) y/o metaplasia de los túbulos digestivos. La metaplasia supone la sustitución de los fondos de saco terminales secretores/absorbentes (acini) por conductos de absorción/transporte de apariencia similar al esófago posterior. Estos cambios morfológicos se acompañan de anorexia, y consumo de las reservas de glucógeno seguido de uso del músculo del pie como fuente de energía, y la muerte (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 1997; 2007; Kismohandaka *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 2000; 2001b). El pie de los abulones afectados contiene escasos haces musculares y menos organizados, un abundante tejido conectivo y más células serosas que los individuos no afectados (Friedman *et al.*, 2007; Moore *et al.*, 2000; Van Blaricom *et al.*, 1993). Los abulones supervivientes parecen quedar infectados, incluso en ambientes de baja temperatura del agua, como en el norte de California (Friedman & Finley, 2003).

2.3.1. Mecanismos de transmisión

La transmisión de *X. californiensis* es horizontal y se supone que a través de la ruta oral-fecal. La exposición de los abulones a agua de mar que contiene material infeccioso es suficiente para que se produzca la transmisión de la bacteria, y no es necesario ningún contacto directo con los animales (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2000; 2001b). Se ha observado que las temperaturas inferiores a 13°C limitan la transmisión de la bacteria (es decir, hacen que la transmisión sea inferior al 1%) en comparación con los abulones mantenidos a una temperatura de ~18°C (transmisión del 72%–94%) (Braid *et al.*, 2005).

2.3.2. Prevalencia

Tabla 2.1. Variación en la prevalencia de *Xenohaliotis californiensis* en diversas especies y localizaciones

Especie	Prevalencia por PCR		Prevalencia por histología		Referencias
	Salvaje	De piscifactoría	Salvaje	De piscifactoría	
<i>Haliotis rufescens</i>	ND	0–100%	1–75% ¹	0–100% ²	Friedman & Finley, 2003; Moore <i>et al.</i> , 2000; Friedman, observaciones no publicadas.
<i>Haliotis cracherodii</i>	ND	NA	74–98%	NA	Friedman & Finley, 2003
<i>Haliotis sorenseni</i>	0	0–100%	0	0–100%	Friedman <i>et al.</i> , 2007; Moore <i>et al.</i> , observaciones no publicadas
<i>Haliotis fulgens</i>	ND	ND	44–100%	ND	Moore <i>et al.</i> , 2009; Tinajero <i>et al.</i> , 2002
<i>Haliotis corrugate</i>	ND	ND	62–63%	ND	Tinajero <i>et al.</i> , 2002
<i>Haliotis walallensis</i>	NA	NA	0	NA	J.D. Moore, observaciones no publicadas
<i>Haliotis discus-hannai</i>	ND	0	0	0	C.S. Friedman, observaciones no publicadas
<i>Haliotis diversicolor supertexta</i>	ND	61%	ND	53%	Wetchateng, 2008; Wetchateng <i>et al.</i> , 2010 ³
<i>Haliotis tuberculata</i>	ND	ND	0%	14,5–52%	Balseiro <i>et al.</i> , 2006

¹Se han observado prevalencias del 1–17% en el norte de California y hasta del 75% en el sur y centro de California.

²Los abulones mayores suelen tener una mayor prevalencia de infección.

³Solamente se obtuvieron muestras de 36 animales de una sola granja de Tailandia. ND = no hay datos; NA = no aplicable.

2.3.3. Distribución geográfica

Xenohaliotis californiensis se da a lo largo de la costa del sudoeste de Norteamérica en California (Estados Unidos) y en Baja California (México). Sin embargo, como se han transportado abulones infectados a Chile, China (República Popular de), España, Islandia Irlanda, Israel, Japón, Tailandia, Taipei chino y posiblemente otros países, se sospecha que el ámbito geográfico del agente etiológico es amplio en los lugares en los que se produce el abulón rojo de California, *Haliotis rufescens*, o las áreas en las que las especies autóctonas han estado en contacto con abulones rojos (por ejemplo, Wetchateng, 2008).

2.3.4. Mortalidad y morbilidad

La susceptibilidad varía según la especie, puesto que se sabe que la bacteria causa la enfermedad en el abulón negro (mortalidad de hasta un 99%; Moore *et al.*, 2009), blanco (mortalidad de hasta un 100%; Friedman & McCormick, observaciones no publicadas), rojo (mortalidad de hasta un 35%; Moore *et al.*, 2000; 2001b), rosado (también llamado amarillo) y verde (también llamado azul) (Tinajero *et al.*, 2002). A diferencia de lo que ocurre con otras especies de abulón estudiadas hasta la fecha, la magnitud de la mortalidad de los abulones rosados y verdes no está bien documentada. Sin embargo, en Baja California (México), hasta un 100% de los abulones verdes (azules) y un 63% de los rosados (amarillos) pueden estar infectados, y hasta un 43% de los abulones verdes y un 71% de los rosados presentan signos microscópicos de la enfermedad (degeneración o metaplasia de la glándula digestiva; Tinajero *et al.*, 2002). El periodo de incubación varía con la temperatura, pero es característico que haya un periodo prolongado de 3–7 meses antes de que aparezcan las manifestaciones. Es característico que la muerte se produzca 1–2,5 meses después de la aparición de los signos clínicos visibles (Friedman *et al.*, 1997). *Xenohalotis californiensis* se ha observado recientemente, mediante datos histológicos y moleculares, en varios países de Asia, incluida China (República Popular de), Taipei chino y Tailandia (Wetchateng, 2008; Wetchateng *et al.*, 2010). La prevalencia no ha sido bien documentada, pero hasta un 61% de los individuos de *H. diversicolor supertexta* presentaron la infección en una granja de Tailandia; sin embargo, al igual que en el abulón de Europa, *H. tuberculata*, no hubo ningún abulón que mostrara signos clínicos del síndrome de marchitamiento (Balseiro *et al.*, 2006).

2.3.5. Factores ambientales

La enfermedad (síndrome de marchitamiento) se produce a temperaturas del agua elevadas (~18–25°C) en los abulones con infecciones moderadas o graves (Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2000; 2002; Moore *et al.*, 2000; 2011; Rosenblum *et al.*, 2008). La transmisión del parásito se ve potenciada en los abulones alimentados (94%) en comparación con los que no reciben alimento (72%) (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005). Se han observado infecciones subclínicas en *H. diversicolor supertexta* criado a 27–29°C. Dado que los abulones son especies marinas obligadas, no se han investigado las tolerancias de salinidad del organismo de tipo rickettsia (OTR).

2.4. Control y prevención

La prevención más eficaz es la evitación del patógeno. En el caso de que se produzca la infección, mantener los abulones a una temperatura $\leq 15^{\circ}\text{C}$ puede reducir la transmisión de los OTR y la ulterior transmisión de la enfermedad (Braid *et al.*, 2005). La aplicación de oxitetraciclina (véase el Apartado 2.4.2 más adelante) reduce las pérdidas.

2.4.1. Vacunación

La vacunación no es una opción viable para el control de la infección por *X. californiensis*.

2.4.2. Tratamiento con sustancias químicas

La reducción de las densidades y la aplicación de una dieta medicada con oxitetraciclina pueden reducir las pérdidas (Friedman *et al.*, 2003; 2007; Rosenblum *et al.*, 2008). La administración oral de TM-100 al 12%–19% (90–100 mg kg⁻¹) en una dieta medicada, durante 10 o 20 días, proporciona una protección frente a la reinfección bacteriana durante varios meses. Algunos datos recientes sugieren que una única administración oral diaria de TM-100 al 12% puede reducir la prevalencia de las infecciones bacterianas del 80% al 10% y la intensidad media de la infección de 1,4 a 0,1 en una escala de 0–3 (Friedman *et al.*, 2000; 2007). Teniendo en cuenta las observaciones realizadas con oxitetraciclina en abulones no medicados que han recibido agua de mar procedente de animales tratados, se cree que la administración del fármaco o el agua de mar que lo contenga o la absorción pueden ser la vía clave de la captación de este producto terapéutico (Friedman *et al.*, datos no publicados)

2.4.3. Inmunoestimulación

No existen datos sobre la inmunoestimulación como medida de control para esta enfermedad.

2.4.4. Selección genética a favor de la resistencia

Está aumentando el interés por la selección de abulones resistentes, en especial con vistas a la restauración. Se ha continuado la recogida del abulón negro salvaje a lo largo de las Chanel Islands de California desde 2002 y algunas de las muestras recogidas sobreviven, lo cual sugiere que estos individuos pueden ser más resistentes a esta enfermedad producida por una rickettsia (Tinajero *et al.*, 2002). Estudios recientes de laboratorio han puesto de manifiesto un aumento de la resistencia a la enfermedad en los animales descendientes de abulones negros que sobrevivieron a la infección por *X. californiensis* en comparación con los procedentes de poblaciones seleccionadas sin la enfermedad (Friedman *et al.* datos no publicados).

2.4.5. Repoblación con especies resistentes

En la actualidad no existen datos al respecto, y es preciso tener en cuenta las ventajas comparativas de la producción de especies alternativas.

2.4.6. Agentes bloqueantes

No existen datos.

2.4.7. Desinfección de huevos y larvas

No se ha realizado ningún intento de desinfección de los huevos y las larvas. Las larvas de abulón no se alimentan, y es improbable que se produzca una transmisión antes del asentamiento y la metamorfosis, después de la cual se inicia la alimentación (Moore & Friedman, datos no publicados).

2.4.8. Prácticas generales de manejo

Las prácticas de manejo para reducir los problemas causados por *X. californiensis* son las habituales para cualquier enfermedad bacteriana e incluyen la compra de ejemplares para siembra inspeccionados (carentes de signos de infección), el mantenimiento por separado de familias o grupos (es decir, evitar un enriquecimiento o mezcla de grupos distintos), el lavado de las manos y el equipo con agua dulce o agua yodada y el secado entre los usos. Si es posible, se recomienda el aislamiento de los grupos infectados. Si se emplea un tratamiento con oxitetraciclina, la aplicación terapéutica siguiendo las directrices federales (por ejemplo las de la FDA-CVM¹ en los Estados Unidos o las de la EMEA² en Europa) antes de la estación de agua más cálida puede reducir las pérdidas y la infección. Habitualmente, es necesaria una sola aplicación durante el segundo o tercer años de crecimiento durante un ciclo de cultivo típico de 3–4 años.

3. Obtención de muestras

3.1. Elección de ejemplares

Para la obtención de muestras ordinaria, se recomienda una selección aleatoria o al azar de los individuos, y el número óptimo de muestras obtenidas variará según el tamaño de la población y el nivel de detección deseado (por ejemplo, $n=60$ para una población de más de 2000 individuos). Para optimizar la detección (obtención de muestras dirigida), se recomienda la selección de abulones que muestren el signo clínico de reducción de peso (atrofia del músculo del pie). Si es posible, las muestras de animales deben obtenerse tras la exposición a un periodo (por ejemplo, 30 días) de agua cálida (por ejemplo, temperatura $>18^{\circ}\text{C}$).

3.2. Conservación de las muestras para su envío

Las muestras deben colocarse en etanol no desnaturalizado al 80%-95% (1:9 [vol/vol] de tejido:etanol) y conservarse a temperatura de entre 4°C y 20°C . También pueden congelarse las muestras de forma rápida en nitrógeno líquido y conservarse a -80°C hasta el momento del análisis. Las muestras conservadas en etanol deben enviarse al laboratorio en hielo, aplicando las directrices nacionales o internacionales para el envío de productos inflamables, según sea aplicable. Las muestras congeladas deben enviarse en hielo seco, según las normas de envío nacionales o internacionales, según sea aplicable.

1 Food and Drug Administration de Estados Unidos – Center for Veterinary Medicine.

2 Agencia Europea del Medicamento.

3.3. Combinación de varias muestras

Lo ideal es extirpar y conservar las muestras de manera individual. Si se desea combinarlas como medida de ahorro de costes, se recomienda combinar las muestras ($n=5$ /combinación) para la extracción del ADN y los posteriores análisis de PCR. Con objeto de tener en cuenta la posible dilución del ADN buscado como consecuencia de la combinación de muestras, las reacciones de PCR deben realizarse por triplicado.

3.4. Órganos y tejidos de elección

El mejor tejido a estudiar es el del esófago posterior, seguido del tejido del complejo glándula digestiva/intestino.

3.5. Muestras/tejidos que no son adecuados

Los tejidos no digestivos no contienen ADN de rickettsia y debe evitarse su empleo.

4. Métodos de diagnóstico

Los signos macroscópicos de la enfermedad, cuando se dan, consisten en atrofia del pie, glándula digestiva moteada, anorexia, debilidad y letargia. Obsérvese que los animales pueden presentar una infección preclínica durante el periodo de incubación, en las especies más resistentes a la enfermedad o en los animales que se mantienen a una temperatura del agua $\leq 15^{\circ}\text{C}$. La enfermedad se caracteriza por la presencia de inclusiones bacterianas intracitoplásmicas en el esófago posterior, el intestino y los epitelios de absorción/transporte de la glándula digestiva, mientras que las infecciones moderadas o avanzadas se asocian de forma característica a alteraciones degenerativas o metaplásicas en la glándula digestiva, seguido de la atrofia del músculo del pie en las especies susceptibles.

4.1. Métodos de diagnóstico de campo

4.1.1. Signos clínicos

Los abulones infectados por *X. californiensis* pueden presentar una infección subclínica durante el periodo anterior a que la enfermedad se haga patente o a temperaturas del agua $\leq 15^{\circ}\text{C}$. Los individuos infectados pueden presentar una consunción (atrofia) entre leve y grave, si las condiciones de temperatura del agua lo permiten.

4.1.2. Alteraciones del comportamiento

Durante una epidemia, los abulones afectados se cuelgan a menudo de substratos horizontales (en vez de hacerlo de substratos verticales o invertidos) y tienen un aspecto débil (se pueden separar fácilmente del substrato con la mano) y marchito (atrofiado) (Haaker *et al.*, 1992). Los abulones de piscifactoría mostrarán también anorexia. Además, la presencia de un número anormalmente alto de conchas nuevas puede indicar también enfermedad.

4.2. Métodos clínicos

4.2.1. Anatomopatología macroscópica

La caracterización clínica de la enfermedad producida por *X. californiensis* se basa en una combinación de alteraciones morfológicas de los tejidos con la presencia del agente etiológico. Las alteraciones morfológicas consisten en una atrofia del músculo del pie, que es visible a nivel macroscópico y microscópico (histología). Como consecuencia directa del catabolismo del pie, los abulones infectados excretan unas cantidades de amonio sustancialmente mayores que las que se producen en los individuos no afectados (Kismohandaka *et al.*, 1995). Si se identifican abulones moribundos, la observación de una glándula digestiva moteada (de color marrón oscuro con pequeños focos de tejido de color bronce), indicativa de alteraciones metaplásicas, es un dato que hace presumir la presencia de esta enfermedad (Friedman *et al.*, 2000).

4.2.2. Bioquímica clínica

Puede utilizarse un análisis estándar de glucógeno (Balseiro *et al.*, 2006) para evaluar la posible presencia de una pérdida de glucógeno en la glándula digestiva y el músculo del pie. Sin embargo, una disminución del glucógeno está relacionada con la anorexia y la incapacidad de digerir el alimento y, por tanto, no es específica de esta enfermedad (es decir, sus efectos son similares a los de la falta de alimentación [Balseiro *et al.*, 2006]).

4.2.3. Anatomopatología microscópica

Presencia de inclusiones bacterianas intracitoplásmicas ovales y basófilas en los epitelios digestivos (esófago posterior, conductos de transporte y epitelios metaplásicos de la glándula digestiva o el intestino). Las alteraciones metaplásicas en la glándula digestiva que incluyen la transformación de los fondos de saco (acini) secretores terminales en epitelios de absorción/transporte, están amplificadas en los abulones infectados por *X. californiensis* (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2000; 2001b). Aunque la metaplasia se ha observado en todas las especies afectadas examinadas hasta la fecha, la respuesta a la infección puede variar entre distintos hospedadores. Así por ejemplo, el abulón rojo y el abulón blanco responden habitualmente con una alteración metaplásica (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2000), mientras que el abulón negro responde generalmente con una combinación de metaplasia, degeneración del túbulo digestivo e inflamación (Friedman *et al.*, 1997; 2002). Los individuos afectados contienen menos glucógeno del pie y una cantidad de haces musculares inferior a la de los individuos no afectados (Balseiro *et al.*, 2006; Braid *et al.*, 2005; Gardner *et al.*, 1995). En algunos abulones puede observarse un aumento de las células serosas en el músculo del pie (Van Blaricom *et al.*, 1993), pero estos signos no son patognomónicos de esta enfermedad. Los abulones blancos juveniles pueden mostrar una aparente metaplasia digestiva sin presencia de *X. californiensis* (Friedman *et al.*, 2007). Así pues, la presencia de *X. californiensis* en epitelios digestivos, conjuntamente con las alteraciones morfológicas descritas indica la presencia del síndrome clínico de marchitamiento.

4.2.4. Preparaciones húmedas

Aunque no se recomienda, las inclusiones citoplasmáticas pueden observarse mediante contraste de fase o iluminación DIC de tejidos del esófago posterior; la morfología de los tejidos digestivos hace que las preparaciones húmedas sean difíciles de interpretar.

4.2.5. Frotis

Pueden usarse frotis teñidos de epitelios digestivos para observar las inclusiones bacterianas. Sin embargo, el examen de pequeños fragmentos del esófago posterior que han sido desecados sobre un portaobjetos y teñidos con fluorocromo de ADN puede ser más fácil de interpretar que los frotis teñidos.

4.2.6. Cortes fijados

No aplicable.

4.2.7 Microscopía electrónica/citopatología

La microscopía electrónica de transmisión (MET) puede utilizarse para confirmar la presencia de OTR. Sin embargo, esto no tiene valor confirmativo respecto a la presencia de este agente, dada la falta de unas características morfológicas distintivas. Si se emplea, la MET mostrará la presencia de colonias intracelulares de procariotas de forma bacilar y ricas en ribosomas, con paredes celulares trilaminares, dentro de vacuolas rodeadas por membrana, en el citoplasma de las células epiteliales gastrointestinales. La bacteria dimórfica, con una forma bacilar o esférica, mide una media de 332 × 1550 nm en la forma bacilar y una media de 1405 nm en el monotipo esférico. La bacteria se reproduce dentro de vacuolas intracitoplásmicas de un diámetro de 14–56 µm (Friedman *et al.*, 2000).

4.3. Métodos de detección e identificación del agente

4.3.1. Métodos directos de detección

En los apartados siguientes se describen varios métodos para identificar y observar la presencia de *X. californiensis* en muestras de tejido o en ADN extraído.

4.3.1.1. Métodos microscópicos

4.3.1.1.1. Preparaciones húmedas

Los tejidos (esófago posterior) pueden extirparse, colocarse sobre un portaobjetos y examinarse con el empleo de microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) o de contraste de fase a ×200 o ×400 aumentos tras haberlos aplastado con un cubreobjetos. Se aprecian inclusiones de rickettsias e inclusiones esféricas claras en el interior de los epitelios esofágicos. No se recomienda el uso de este método puesto que las inclusiones pueden ser difíciles de identificar.

4.3.1.1.2. Frotis

Pueden usarse improntas de tejido para detectar intensidades moderadas o altas de infección por *X. californiensis*. Sin embargo, la histología es más sensible que las improntas de tejido.

- a) *Método de tinción*: Obtener un corte del esófago posterior y colocarlo sobre el portaobjetos. Fijar el frotis en metanol y teñirlo con Giemsa modificado. Secar y observar mediante microscopía de inmersión en aceite para identificar inclusiones de rickettsias o colocar un cubreobjetos y examinar a $\times 200$ – 400 aumentos.
- b) *Método fluorescente*: Obtener un corte del esófago posterior, trocearlo y colocarlo sobre un portaobjetos, secar con un secador de cabello durante ~20 minutos. Teñir los portaobjetos con un colorante fluorescente para ácido nucleico, como yoduro de propidio o Hoechst 33258 (Haaker *et al.*, 1992). Incubar en oscuridad durante 3 minutos y examinar mediante epifluorescencia a $\times 200$ aumentos. Las inclusiones bacterianas se diferencian de los núcleos del hospedador por su tamaño y frecuencia. Sin embargo, si se van a conservar portaobjetos de muestra para un futuro examen, deben secarse por completo y guardarse desecados hasta la tinción.

Las inclusiones del parásito, de un diámetro de 14–56 μm , aparecen dispersas por entre los núcleos más pequeños del hospedador. Un tiempo de observación de 5 minutos por portaobjetos es suficiente a $\times 200$ aumentos (Moore *et al.*, 2001a). Este método es menos sensible que la histología y no permite diferenciar la morfología bacteriana. Es mejor utilizarlo como método de examen rápido dentro del ámbito conocido de esta enfermedad.

Estas pruebas no han sido validadas y no se comercializan.

4.3.1.1.3. Cortes fijados

Histología

El procedimiento histológico se detalla en el Capítulo 2.4.0 de este *Manual Acuático*. Retirar la concha y obtener varios cortes transversales de 3–5 mm que contengan esófago posterior, glándula digestiva y músculo del pie. Colocar el tejido obtenido en soluciones de Davidson o Carson (véase el Capítulo 2.4.0 de este *Manual Acuático*) durante 24 horas y procesarlo para histología ordinaria en parafina. Los cortes transversales se manejan con mayor facilidad cuando se colocan en casetes antes de la fijación. La proporción no debe ser superior a un volumen de tejido por diez volúmenes de fijador.

Los cortes de 3–5 μm desparafinados deben teñirse con hematoxilina y eosina y observarse al microscopio óptico para identificar inclusiones de bacterias (vacuolas intracitoplásmicas basófilas oblongas, de 14–56 μm de diámetro [Friedman *et al.*, 2000]) en el esófago posterior y al glándula digestiva, y alteraciones morfológicas en la glándula digestiva y el pie. Se recomienda examinar los cortes a $\times 200$ o $\times 400$ aumentos.

Xenohalotia californiensis puede ser morfológicamente similar a otras bacterias marinas de tipo rickettsia. En los abulones de California, se han observado hasta tres bacterias intracitoplásmicas morfológicamente distintas (Friedman *et al.*, datos no publicados). El diagnóstico definitivo de la bacteria puede incluir el uso de herramientas moleculares (por ejemplo, hibridación *in-situ* [ISH]). Un diagnóstico definitivo de síndrome de marchitamiento mediante histología debe incluir la presencia de la bacteria y de alteraciones morfológicas en la glándula digestiva, metaplasia y/o degeneración, y puede incluir las alteraciones del músculo del pie.

Cuando se han observado pérdidas dentro del ámbito geográfico conocido del síndrome de marchitamiento, la visualización de focos bacterianos intracelulares en el interior de los epitelios digestivos, mediante el examen histológico, puede considerarse un método confirmativo y se toma como método de referencia para esta enfermedad. Sin embargo, se recomienda la confirmación con el empleo de histología combinada con PCR y análisis de secuencia o ISH, para verificar la identificación de la bacteria de tipo rickettsia en especies de abulón que anteriormente no se supiera que eran susceptibles a la bacteria, así como cuando se produce la infección en una nueva localización geográfica.

La prueba no ha sido validada formalmente. Sin embargo, la histología se ha considerado una prueba confirmativa para la presencia de *X. californiensis*.

Examen mediante microscopía electrónica de transmisión

Los procedimientos de la microscopía electrónica de transmisión se describen en el Capítulo 2.4.0 de este *Manual Acuático*. Se observan procariotas de forma bacilar y ricas en ribosomas, con

paredes celulares trilaminares, acumulados en colonias intracelulares dentro de vacuolas envueltas por membrana, en el citoplasma de las células epiteliales gastrointestinales. La bacteria dimórfica, de una forma bacilar o esférica, mide una media de 332 × 1550 nm en la forma de bacilo y una media de 1405 nm en el morfotipo esférico. La bacteria se reproduce en el interior de las vacuolas intracitoplásmicas de 14–56 µm de diámetro (Friedman *et al.*, 2000). Esta prueba no ha sido validada formalmente.

4.3.1.2. Aislamiento e identificación del agente

La propagación de *X. californiensis* a través de cultivo celular (dada la falta de líneas celulares derivadas de moluscos marinos) y en medios artificiales no ha sido posible hasta la fecha.

4.3.1.2.1. Cultivo celular/medios artificiales

No se ha desarrollado ninguno.

4.3.1.2.2. Métodos de detección del antígeno basados en anticuerpos

No se ha desarrollado ninguno.

4.3.1.2.3. Técnicas moleculares

4.3.1.2.3.1. Reacción en cadena de polimerasa

Una amplificación de PCR positiva aporta tan solo un diagnóstico provisional, puesto que detecta el ADN y no necesariamente un patógeno viable. Deben usarse otras técnicas, preferiblemente histología e ISH, para visualizar el patógeno. Cuando se emplea de manera combinada con la histología, la PCR puede usarse con fines de confirmación. Se recomienda el examen de la secuencia amplificada cuando se examina una nueva especie hospedadora o una nueva área geográfica. Las secuencias deben concordar con la secuencia conocida de ADN_r de 16S de esta bacteria (GenBank, acceso AF133090; [Andree *et al.*, 2000]).

Las muestras para la PCR deben obtenerse del esófago posterior o la glándula digestiva y deben procesarse con el empleo del método de extracción clásico en fenol-cloroformo o con los kits de extracción de ADN comerciales diseñados para eliminar los inhibidores (por ejemplo, kits de extracción de ADN de deposiciones o del suelo), que están presentes en la glándula digestiva de los abulones. Se recomienda el tejido del esófago posterior ya que las infecciones son uniformemente más intensas que en el tejido de la glándula digestiva. Debe incluirse siempre en la PCR una reacción de control positiva, que debe consistir en ADN genómico extraído de un individuo con una infección conocida o en el uso de un plásmido que contenga una inserción del producto amplificado. Si se va a utilizar un plásmido como control positivo, se recomienda añadir una inserción de ~100 pb al fragmento clonado, con objeto de reducir la posibilidad de contaminación cruzada del ADN plasmídico aerosolizado. Además, en situaciones en las que hay un número bajo de copias del ADN diana, este plásmido puede competir con la diana y desplazarla. Debe incluirse también un control negativo, consistente en una mezcla de referencia sin la adición de la plantilla, en cada PCR. Todas las reacciones deben realizarse por duplicado. La observación de una banda de 160 pb en muestras de tejido y reacciones de control positivas, así como la ausencia de bandas en las reacciones de control negativas, caracterizan la obtención de una prueba satisfactoria. La sensibilidad y especificidad de esta prueba están en proceso de evaluación formal por parte del Laboratorio de Referencia de la OIE (Friedman *et al.*, datos no publicados.). En la actualidad la prueba no se comercializa.

Los cebadores de PCR desarrollados para la detección de *X. californiensis* amplifican específicamente un segmento de 160 pb del patógeno de tipo *Rickettsia*. Los cebadores se designan actualmente como: RA 5-1 (5'-GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C-3') y RA 3-6 (5'-ACT-TGG-ACT-CAT-TCA-AAA-GCG-GA-3'). Van dirigidos al ADN ribosómico de subunidad pequeña y se ha observado que son sensibles y específicos para este patógeno (Andree *et al.*, 2000). La amplificación de PCR se realiza en un volumen de reacción estándar de 20 µl con un contenido de 1 × tampón de PCR, MgCl₂ 1,5 mM, 400 ng ml⁻¹ de BSA, una concentración 200 µM de los diversos dNTP, una concentración 0,5 µM de cada cebador, 1,6 unidades de Taq polimerasa, y 100 ng de ADN plantilla. Los ciclos de las mezclas de reacción se realizan en un ciclador térmico. El programa para la reacción de amplificación es el siguiente: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, 40 ciclos a 95°C durante 1 minuto, 62°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Se verifica en una muestra alícuota de cada reacción de PCR para detectar el producto de amplificación de 160 pares de bases mediante electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

La prueba ha sido validada con una especificidad y sensibilidad diagnósticas de 1,0 (Friedman *et al.*, datos no publicados). No está comercializada.

4.3.1.2.3.2 Análisis de secuencia

Es necesario un análisis del ADN amplificado para confirmar la identidad de secuencia con la bacteria que se pretende identificar (GenBank Accession AF133090). Esto puede conseguirse mediante una clonación estándar y secuenciación de múltiples clones tras la amplificación mediante PCR del ADN de la muestra. (Nota. Se recomienda una secuenciación tanto directa como inversa.) También puede utilizarse una secuenciación directa de los productos de PCR.

4.3.1.2.3.3 Hibridación *in-situ*

La ISH es el método de elección para confirmar la identificación ya que permite visualizar una sonda específica hibridada con el organismo diana. Sin embargo, las sondas de ADN deben ser evaluadas de forma exhaustiva respecto a su especificidad y deben ser validadas en estudios comparativos antes de poder utilizarlas para una identificación confirmativa.

Se ha desarrollado una ISH para detectar procariontes de tipo rickettsia en cortes de tejido (Antonio *et al.*, 2000). Se hibridan sondas de oligonucleótidos marcadas específicas con el ARN ribosómico de subunidad pequeña de la bacteria. Esta hibridación es detectada por un anticuerpo conjugado que reconoce las sondas marcadas. Se añade el sustrato para el anticuerpo conjugado, y ello causa una reacción colorimétrica que permite la visualización de las hibridaciones de ADN de sonda-parásito. Aunque este método no ha sido validado formalmente, las pruebas realizadas para evaluar su especificidad con el empleo de varios organismos de tipo rickettsia en peces y bivalvos sugirieron que la prueba era específica para *X. californiensis* (Antonio *et al.*, 2000).

El procedimiento de la ISH se lleva a cabo de la siguiente forma. Deben incluirse controles positivos (tejidos infectados conocidos) y negativos (no infectados o infectados por una bacteria diferente) en el procedimiento. La sonda se elabora mediante PCR con el empleo de un kit de síntesis de sonda PCR DIG Probe Synthesis Kit. Antes de utilizar la sonda marcada con DIG, se desnatura la sonda a 95°C durante 3 minutos y se coloca inmediatamente en hielo durante ~30 minutos, con objeto de separar el ADN de doble hebra. Se mantiene a -20°C o -80°C hasta el momento del uso. Las secuencias de las sondas designadas como RA 5-1, RA 3-6, RA 3-8 y RA 5-6 (Antonio *et al.*, 2000) son, respectivamente, las siguientes: 5'-GTT-GAA-CGT-GCC-TTC-AGT-TTA-C-3', 5'-ACT-TGG-ACT-CAT-TCA-AAA-GCG-GA-3', 5'-CCA-CTG-TGA-GTG-GTT-ATC-TCC-TG-3' y 5'-GAA-GCA-ATA-TTG-TGA-GAT-AAA-GCA-3'.

- i) Tras retirar la concha, se obtiene un corte transversal (3–5 mm) de tal manera que contenga esófago posterior, glándula digestiva y músculo del pie, y se coloca en fijador AFA de Davidson (glicerina [10%], formol [20%], etanol al 95% [30%], dH₂O [30%], ácido acético glacial [10%]) durante 24–48 horas, y a continuación se transfiere a etanol al 70% hasta el procesamiento mediante procedimientos histológicos (paso ii). La proporción no debe ser superior a 1 volumen de tejido por 10 volúmenes de fijador.
- ii) Las muestras se incluyen luego en parafina con métodos histológicos convencionales. Se obtienen cortes a 5–6 µm y se colocan en portaobjetos con carga eléctrica positiva o recubiertos con 3-aminopropil-trietoxilano. A continuación se secan los cortes histológicos durante una noche en un horno a 40°C. Nota. El paso de secado puede omitirse si se emplean portaobjetos con carga eléctrica positiva.
- iii) Se desparafinan los cortes mediante inmersión en xileno u otro agente de eliminación menos tóxico, durante 10 minutos. Se elimina el disolvente mediante inmersión en dos baños sucesivos en alcohol absoluto, durante 10 minutos cada uno y se rehidrata con inmersión en una serie de etanol. Luego se lavan los cortes dos veces durante 5 minutos en tampón Tris (pH 7,2; Tris/HCl 0,2 M, CaCl 2,0 mM).
- iv) Los cortes se tratan con proteinasa K, 50 µg ml⁻¹ en tampón Tris, a 37°C durante 45 minutos. Este reacción se interrumpe entonces mediante el lavado de los cortes en PBS tres veces durante 10 minutos cada una.
- v) Los cortes se prehibridan durante 10 minutos a 1 hora a 37°C en tampón de prehibridación (4 x SSC, formamida al 50%).
- vi) A continuación se elimina la solución de prehibridación mediante lavado en 2x SSC y se seca brevemente antes de la sustitución por tampón de prehibridación que contiene las sondas marcadas con digoxigenina (1:373, sonda:tampón [vol:vol]). Los cortes pueden desnaturalizarse* colocándolos en un calentador a 100°C durante 10 minutos y luego se

Se cubren con cubreobjetos de plástico de ISH. A continuación se hibridan las preparaciones durante una noche a 53°C en cámara húmeda. *Este paso puede omitirse si se desea.

- vii) Se retiran cuidadosamente los cubreobjetos mediante la inmersión de las preparaciones durante 5-10 minutos en 2x SSC a temperatura ambiente. Se lavan los cortes dos veces durante 15 minutos en 2 x SSC a 40°C, tres veces durante 15 minutos en 1 x SSC a 40°C, y una vez durante 15 minutos en 0,5 x SSC a 40°C. Los cortes se colocan entonces en Tampón 1 (Tris/HCl 100 mM, NaCl 10 mM, pH 7,5) durante 10 minutos.

Se colocan los cortes en Tampón 1 (véase el paso vii) con un suplemento de Triton X-100 al 0,3% y suero de carnero al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente (no dejar que los cortes se sequen).

El anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina anti-digoxigenina se diluye a 1:1000 (o según las recomendaciones del fabricante) en Tampón 1 con un suplemento de Triton X-100 al 0,3% y suero de carnero al 1% y se aplica a los cortes de tejido. Los cortes se cubren con cubreobjetos de ISH y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente en la cámara húmeda.

- x) Se lavan las preparaciones dos veces en Tampón 1 durante 10 minutos cada una (véase el paso vii) y dos veces en Tampón 2 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, pH 9,5) durante 10 minutos. Se aplica la solución de revelado de color (añadir 45 µl de nitroazul de tetrazolio, 35 µl de sal de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato p-toluidina [BCIP] a 10 ml de Tampón 2) durante 30 minutos a 1 hora en cámara húmeda en oscuridad.
- xi) A continuación se lavan las preparaciones 3x en agua destilada estéril (dH₂O). Se aplica a los cortes una tinción de contraste con Bismarck Brown Y durante 3 minutos, se lavan en dH₂O, y luego en etanol al 70%, seguido de un breve lavado en etanol al 100% antes del secado al aire, y se aplican cubreobjetos utilizando un medio de montaje. La presencia del patógeno se pone de manifiesto en el marcado de color púrpura-negro de las células parasitarias.

Esta prueba no ha sido validada formalmente y no se comercializa.

4.3.1.2.4. Purificación del agente

No se ha desarrollado ninguna hasta la fecha.

5. Idoneidad de las pruebas para cada uso previsto

Los métodos actualmente disponibles para la vigilancia dirigida y el diagnóstico de *X. californiensis* se indican en la Tabla 5.1. Las designaciones utilizadas en la Tabla indican lo siguiente: a = el método es el método recomendado por razones de disponibilidad, utilidad y especificidad y sensibilidad diagnósticas; b = el método es un método estándar con una buena sensibilidad y especificidad diagnósticas; c = el método tiene aplicación en algunas situaciones, pero el coste, la exactitud u otros factores limitan gravemente su aplicación; y d = el método no se recomienda en la actualidad para este fin. Estas designaciones son algo subjetivas ya que la idoneidad implica cuestiones de fiabilidad, sensibilidad, especificidad y utilidad. Aunque no todas las pruebas indicadas como de categoría a o b han sido objeto de una estandarización y validación formales, su carácter de uso habitual y el hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hacen aceptables.

Tabla 5.1. Métodos para la vigilancia y el diagnóstico dirigidos

Método	Vigilancia dirigida			Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	Juveniles	Adultos		
Signos macroscópicos	d	c	c	c	d
Bioanálisis	d	d	c	c	c(a) ¹
Impronta de tejido – tinción de Giemsa	d	c	c	b	b(c) ²
Histopatología	d	b	b	a	a ³
ME de transmisión	d	d	d	b	c
Sondas de ADN – <i>in situ</i>	d	c	c	a	a

Método	Vigilancia dirigida			Diagnóstico provisional	Diagnóstico confirmativo
	Larvas	Juveniles	Adultos		
PCR	d	a	a	a	c(a) ⁴
Secuenciación de ADNr de SSU	d	d	d	a	a

¹Para disponer de una reserva de genitores valiosa, es posible utilizar una reacción en cadena de polimerasa (PCR) de heces como primera prueba de selección y, si es negativa, utilizar luego el método de bioanálisis en combinación con histología (véase el Apartado 6). ²Las improntas de tejido deben usarse en combinación con PCR y posiblemente secuenciación para confirmar el agente. ³En los casos nuevos, como una nueva localización geográfica, se recomienda la PCR y la secuenciación para confirmar la identidad de la bacteria. ⁴La PCR sola no tiene valor confirmativo pero cuando se emplea en combinación con la histología, puede considerarse confirmativa. ME = microscopía electrónica; ADNr de SSU = ADN ribosómico de subunidad pequeña.

6. Prueba(s) recomendada(s) para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de infección por *Xenohalotis californiensis*

Los métodos para la vigilancia dirigida destinada a declarar la ausencia de *X. californiensis* son la histología en combinación con PCR y análisis de secuencia, o mediante ISH. Dado el carácter crónico de la enfermedad y la influencia de la temperatura, se recomienda que los animales de precriadero y de engorde hasta la talla comercial sean examinados durante la estación de agua cálida de la zona. Los abulones mantenidos en aguas frías pueden tener la infección de forma crónica sin mostrar signo alguno de enfermedad. Se recomienda también realizar exámenes de PCR de heces o utilizar un bioanálisis de los abulones más pequeños (por ejemplo de 1–4 cm) mezclados con la reserva de genitores durante al menos 6 semanas a >17°C.

7. Criterios de diagnóstico confirmativo

Según lo indicado en el *Código Acuático*, todos los casos observados en otras especies deben ser trasladados de inmediato al Laboratorio de Referencia de la OIE apropiado para su confirmación, tanto si el caso presenta signos clínicos asociados como si no.

7.1. Definición de caso sospechoso

Un caso sospechoso de infección por *X. californiensis* y enfermedad clínica asociada (síndrome de marchitamiento) puede incluir la observación de signos clínicos macroscópicos (debilidad, letargia, anorexia, atrofia del pie y glándula digestiva moteada) y de mortalidad, de manera asociada a unas condiciones de agua cálida, sobre todo dentro del ámbito geográfico conocido de esta enfermedad. En los abulones de piscifactoría, la anorexia puede ser el primer signo de la enfermedad. Estos signos clínicos, combinados con la observación microscópica de una atrofia del músculo del pie, cuerpos de inclusión en los epitelios gastrointestinales o una PCR (sin confirmación de secuencia) representan también un caso sospechoso.

7.2. Definición de caso confirmado

La confirmación de la infección por *X. californiensis* se basa en la observación del agente con el empleo de histología y PCR con análisis de secuencia o ISH. Los signos macroscópicos y las improntas de tejido por sí solos no pueden utilizarse por sí solos para un diagnóstico confirmativo y deben respaldarse con histología, ISH o PCR con análisis de secuencia.

La confirmación del síndrome de marchitamiento se basa tanto en la presencia del agente como en la presencia de signos microscópicos de la enfermedad. Como mínimo, la infección por *X. californiensis* debe acompañarse de una metaplasia o degeneración de la glándula digestiva, evidenciada en el examen histológico, para que se pueda diagnosticar un síndrome de marchitamiento clínico.

8. Bibliografía

ANDREE K.B., FRIEDMAN C.S., MOORE J.D. & HEDRICK R.P. (2000). A polymerase chain reaction for detection of genomic DNA of a Rickettsiales-like prokaryote associated with Withering Syndrome in Black Abalone (*Halotis cracherodii*). *J. Shellfish Res.*, **19**, 213–218.

- ANTONIO D.B., ANDREE K.B., MOORE J.D., FRIEDMAN C.S. & HEDRICK R.P. (2000). Detection of Rickettsiales-like prokaryotes (RLPs) by *in situ* hybridization in black abalone *Haliotis cracherodii* with withering syndrome. *J. Invertebr. Pathol.*, **75**, 180–182.
- BALSEIRO P., ARANGUREN R., GESTAL C., NOVOA B. & FIGUERAS A. (2006). *Candidatus Xenohaliotis californiensis* and *Haplosporidium montforti* associated with mortalities of abalone *Haliotis tuberculata* cultured in Europe. *Aquaculture*, **258**, 63–72.
- BRAID B.A., MOORE J.D., ROBBINS T.T., HEDRICK R.P., TJEERDEMA R.S. & FRIEDMAN C.S. (2005). Health and survival of red abalone, *Haliotis rufescens*, under varying temperature, food supply and exposure to the agent of withering syndrome. *J. Invertebr. Pathol.*, **89**, 219–231.
- DUMLER J.S., BARBET A.F., BEKKER C.P.J., DASCH G.A., PALMER G.H., RAY S.C., RIKIHISA Y. & RURANGIRWA F.R. (2001). Reorganization of general in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. System. Evol. Microbiol.*, **51**, 2145–2165.
- FRIEDMAN C.S., ANDREE K.B., BEAUCHAMP K.A., MOORE J.D., ROBBINS T.T., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2000). "*Candidatus Xenohaliotis californiensis*" a newly described pathogen of abalone, *Haliotis* spp., along the west coast of North America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**, 847–855.
- FRIEDMAN C.S., BIGGS W., SHIELDS J.D. & HEDRICK R.P. (2002). Transmission of withering syndrome in black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach. *J. Shellfish Res.*, **21**, 817–824.
- FRIEDMAN C.S. & FINLEY C.A. (2003). Evidence for an anthropogenic introduction of "*Candidatus Xenohaliotis californiensis*", the etiological agent of withering syndrome, into northern California abalone populations via conservation efforts. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, **60**, 1424–1431.
- FRIEDMAN C.S., THOMSON M., CHUN C., HAAKER P.L. & HEDRICK, R.P. (1997). Withering syndrome of the black abalone, *Haliotis cracherodii* (Leach): Water temperature, food availability, and parasites as possible causes. *J. Shellfish Res.*, **16**, 403–411.
- FRIEDMAN C.S., TREVELYAN G., MULDER E.P. & FIELDS R. (2003). Development of an oral administration of oxytetracycline to control losses due to withering syndrome in cultured red abalone *Haliotis rufescens*. *Aquaculture*, **224**, 1–23.
- FRIEDMAN C.S., SCOTT B.B., STRENGE R.E. & MCCORMICK T.B. (2007). Oxytetracycline as a tool to manage and prevent losses of the endangered white abalone, *Haliotis sorenseni*, due to withering syndrome. *J. Shellfish Res.*, **26**, 877–885.
- GARDNER G.R., HARSHBARGER J.C., LAKE J., SAWYER T.K., PRICE K.L., STEPHENSON M.D., HAAKER P.L. & TOGSTAD H.A. (1995). Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. *J. Invertebr. Pathol.*, **66**, 111–120.
- HAAKER P.L., PARKER D.O., TOGSTAD H., RICHARDS D.V., DAVIS G.E. & FRIEDMAN C.S. (1992). Mass mortality and withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*, in California. In: Abalone of the World, Shepard S.A., Tegner M.J. & Guzman del Proo S.A., eds, Blackwell Scientific, Oxford, UK, 214–224.
- KISMOHANDAKA G., ROBERTS W., HEDRICK R.P. & FRIEDMAN C.S. (1995). Physiological alterations of the black abalone, *Haliotis cracherodii* Leach, with withering syndrome. *J. Shellfish Res.*, **14**, 269–270.
- MOORE J.D., CHERR G.N. & FRIEDMAN C.S. (2001a). Detection of "*Candidatus Xenohaliotis californiensis*" (Rickettsiales-like prokaryote) inclusions in tissue squashes of abalone (*Haliotis* spp.) gastrointestinal epithelium using a nucleic acid fluorochrome. *Dis. Aquat. Org.*, **46**, 147–152.
- MOORE J.D., JUHASZ C.I., ROBBINS T.T. & VILCHIS I. (2009). Green abalone, *Haliotis fulgens*, infected with the agent of withering syndrome do not express disease signs under a temperature regime permissive for red abalone, *Haliotis rufescens*. *Marine Biol.*, **156**, 2325–2330.
- MOORE J.D., MARSHMAN B.C. & CHUN C.C. (2011). Health and survival of red abalone *Haliotis rufescens* from San Miguel Island, California, USA, in a laboratory simulation of La Niña and El Niño conditions. *J. Aquat. Anim. Health*, **23**, 78–84.

MOORE J.D., ROBBINS T.T. & FRIEDMAN C.S. (2000). Withering syndrome in farmed red abalone *Haliotis rufescens*: Thermal induction and association with a gastrointestinal rickettsia-like prokaryote. *J. Aquat. Anim. Health*, **12**, 26–34.

MOORE J.D., ROBBINS T.T., HEDRICK R.P. & FRIEDMAN C.S. (2001b) Transmission of the Rickettsiales-like prokaryote "*Candidatus Xenohaliotis californiensis*" and its role in withering syndrome of California abalone *Haliotis* spp. *J. Shellfish Res.*, **20**, 867–874.

RAIMONDI P.T., WILSON C.M., AMBROSE R.F., ENGLE J.M. & MINCHINTON T.E. (2002). Continued declines of black abalone along the coast of California: Are mass mortalities related to El Niño events? *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **242**, 143–152.

ROSENBLUM E.S., JUHASZ C., FRIEDMAN C.S., ROBBINS T.T., CRAIGMILL A., TJEERDEMA R.S. & MOORE J.D. (2008). Oxytetracycline as a treatment for abalone withering syndrome Part II: Efficacy, pharmacokinetics, and long term resistance to re-infection at elevated sea water temperatures. *Aquaculture*, **277**, 138–148.

STEINBECK J.R., GROFF J.M., FRIEDMAN C.S., MCDOWELL T. & HEDRICK R.P. (1992). Investigations into mortality among populations of the California black abalone, *Haliotis cracherodii*, on the central coast of California, USA. *In: Abalone of the World*, Shepard S.A., Tegner M.J. & Guzman del Proo S.A., eds. Blackwell Scientific, Oxford, UK, 203–213.

TINAJERO M.D.C.A., CACERES-MARTINEZ J., & AVILES J.G.G. (2002) Histopathological evaluation of the yellow abalone *Haliotis corrugata* and the blue abalone *Haliotis fulgens* from Baja California, Mexico. *J. Shellfish Res.*, **21**, 825–830.

VAN BLARICOM G.R., RUEDIGER J.L., FRIEDMAN C.S., WOODARD D.D. & HEDRICK R.P. (1993). Discovery withering syndrome among black abalone populations at San Nicolas Island, California *J. Shellfish Res.*, **12**, 185–188.

WETCHATENG T. (2008). *Rickettsia*-like organism (RLO) infection in the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*: Histopathology, diagnosis and treatment. PhD. Dissertation, Mahidol University, Bangkok, Thailand, 49 pp.

WETCHATENG T., FRIEDMAN C.S., WIGHT N.A., LEE P.-Y., TENG P.H., SRIURAIRATTANA S., WONGPRASERT K. & WITHYACHUMNARNKUL B. (2010). Withering syndrome in abalone *Haliotis diversicolor supertexta*. *Dis. Aquat. Org.*, **90**, 69–76.

*
* *

NB: Actualmente (2021) no existe ningún Laboratorio de Referencia de la OIE para la infección por *Xenohaliotis californiensis* puede consultarse en la Tabla del final de este *Manual Acuático* o en la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>).

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2006. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2012.